



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110042064 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201910333777.2

A01P 7/04(2006.01)

(22)申请日 2019.04.24

C12R 1/645(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No.15279 2018.01.29

(71)申请人 河北省科学院生物研究所

地址 050081 河北省石家庄市桥西区友谊
南大街46号

(72)发明人 张根伟 李书生 刘振国 马宏

尹淑丽 刘坤昂

(74)专利代理机构 石家庄国为知识产权事务所

13120

代理人 米文智

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

A01N 63/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种香菇菌株及其应用和源于该菌株的杀虫剂及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及食用菌技术领域,具体公开一种香菇菌株及其应用和源于该菌株的杀虫剂及其制备方法。所述制备方法包括如下步骤:将香菇菌棒进行清洗、干燥处理后,进行粉碎处理,得到香菇菌棒粉;与浸提溶剂混合,进行浸提处理,过滤,得到香菇菌棒浸提液,即驱虫剂。本发明提供的杀虫剂的制备方法,工艺简单,操作方便,绿色环保,安全可靠,所得杀虫剂杀虫谱广,安全高效,且具有低毒性、易降解、低残留、环境友好的特点,有助于减少化学杀虫剂的使用和保证食品安全。

1. 一种香菇菌株 *Lentinus edodes* 15, 其保藏号为: CGMCC No.15279。
2. 权利要求1所述的香菇菌株在防治虫害中的应用, 其特征在于: 栽培所述香菇菌株的菌棒或该菌棒的提取物用于防治虫害。
3. 如权利要求2所述的香菇菌株在防治虫害中的应用, 其特征在于: 所述虫害为农业虫害。
4. 一种杀虫剂, 其特征在于, 包括栽培权利要求1所述香菇菌株的菌棒或菌棒的浸提物。
5. 一种权利要求4所述杀虫剂的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤
 - (1) 将香菇菌棒进行清洗、干燥处理后, 进行粉碎处理, 得到香菇菌棒粉;
 - (2) 将所述香菇菌棒粉与浸提溶剂混合, 进行浸提处理, 过滤, 得到包含所述浸提物的浸提液。
6. 如权利要求5所述的杀虫剂的制备方法, 其特征在于: 所述干燥处理的温度为40-50℃, 时间为1.5-2.5h。
7. 如权利要求5所述的杀虫剂的制备方法, 其特征在于: 所述香菇菌棒粉与浸提溶剂的质量比为1:5-7。
8. 如权利要求5所述的杀虫剂的制备方法, 其特征在于: 所述浸提溶剂为水或乙醇。
9. 如权利要求5所述的杀虫剂的制备方法, 其特征在于: 所述浸提处理的温度为30-60℃, 时间为3-6h。

一种香菇菌株及其应用和源于该菌株的杀虫剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食用菌技术领域,尤其涉及一种香菇菌株及其应用和源于该菌株的杀虫剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 香菇(学名:Lentinus edodes),是一种食药真菌,含有丰富的食物纤维、蛋白质、多糖、氨基酸等,具有提高机体免疫功能、延缓衰老、防癌抗癌、降血压、降血脂、降胆固醇、降血糖等多种功能。与其它食用菌种类相比,香菇栽培中虫害较少,预示着香菇菌棒中可能含有某种杀虫物质,但不同香菇品种间存在一定差异。

[0003] 我国香菇主栽品种中,“808”、“168”等属于中大型、硬质优质香菇品种,早在上世纪80年代就开始使用,在长期的传代过程中,开始出现产量下降,抗逆性差,病虫害加重,畸形菇增多等劣化问题。早熟香菇品种“0912”、868等品种,出菇过多、过密,严重影响香菇品质,且单一品种大量栽培,会造成专化病原菌的累积,使病虫害加重。

[0004] 在农业生产尤其食用菌生产中,一般采用化学杀虫剂进行拌料或表面喷洒,达到防虫作用。然而,食用菌子实体吸附能力强,施用化学杀虫剂容易导致农药残留超标,造成严重的食品安全问题。例如,平菇、双孢菇等食用菌,虫害严重,使用化学杀虫农药较为普遍,对食品安全造成极大危害。

[0005] 因此,选育出高产、优质、抗病、抗虫的香菇新品种,研究开发香菇的杀虫物质及应用方法,对于提高食用菌品质、开发生物安全农药、减少化学制剂用量等方面具有重要意义。

发明内容

[0006] 针对现有食用菌虫害严重以及杀虫剂存在的毒性较大,刺激性较强,影响食品安全等问题,本发明提供一种香菇菌株及其应用和源于该菌株的杀虫剂及其制备方法。

[0007] 为达到上述发明目的,本发明实施例采用了如下的技术方案:

[0008] 一种香菇菌株Lentinus edodes 15,其保藏号为:CGMCC No.15279。

[0009] 上述香菇菌株(Lentinus edodes 15,冀香15),该菌株是以香菇868和香菇808为亲本,经系统杂交选育获得,其属香菇(Lentinus edodes),该菌株于2018年01月29日保藏于“中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)”,其保藏号为CGMCC No.15279。冀香15具有早熟、中大型、硬质、抗虫害能力强等优良特性。

[0010] 上述的香菇菌株在防治虫害中的应用,栽培栽培所述香菇菌株的菌棒或该菌棒的提取物用于防治虫害。所述香菇菌株的菌棒或该菌棒的提取物用于防治虫害。

[0011] 进一步地,所述虫害为农业虫害,比如保护食用菌、蔬菜免受虫害的影响。

[0012] 本发明还提供了一种杀虫剂,包括栽培上述所述香菇菌株的菌棒或菌棒的浸提物。包含所述浸提物的浸提液可直接作为杀虫剂使用,也可以与适量的水混合稀释后再作为杀虫剂使用,或者将浸提液除去溶剂后得浸提物以便保存运输。

[0013] 本发明还提供了一种上述杀虫剂的制备方法,包括如下步骤:

[0014] (1) 将香菇菌棒进行清洗、干燥处理后,进行粉碎处理,得到香菇菌棒粉;

[0015] (2) 将所述香菇菌棒粉与浸提溶剂混合,进行浸提处理,过滤,得到包含所述浸提物的浸提液。

[0016] 进一步地,所述干燥处理的温度为40-50℃,时间为1.5-2.5h。

[0017] 进一步地,所述香菇菌棒粉与浸提溶剂的质量比为1:5-7。

[0018] 进一步地,所述浸提溶剂为水或乙醇。

[0019] 进一步地,所述浸提处理的温度为30-60℃,时间为3-6h。

[0020] 相对于现有技术,采用本发明提供的技术方案,可以获得中早熟、中大型、硬质、抗虫害能力强等优良特性的优质香菇冀香15,且冀香15能够应用在防治虫害方面,利用香菇出菇后废弃的冀香15香菇菌棒或菌棒的提取物防治虫害,资源再利用,且绿色环保。此外,由香菇菌棒提取液形成的杀虫剂杀虫谱广,安全高效,且具有低毒性、易降解、低残留、环境友好的特点,有助于减少化学杀虫剂的使用和保证食品安全,该杀虫剂具有广阔的应用前景,可应用于农业、生产及生活中。

具体实施方式

[0021] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0022] 实施例1

[0023] 一种香菇菌株冀香15,通过以808和868为亲本,通过杂交育种方法获得,具体流程如下:

[0024] ①单核菌株制备:

[0025] 原生质体再生培养基(L):土豆200g,葡萄糖20g,酵母粉2g,VB1为10mg,磷酸二氢钾1.0g,硫酸镁0.5g,甘露醇0.6M,蒸馏水1000ml,pH值自然;

[0026] 液体土豆培养基(L):土豆200g,葡萄糖20g,蒸馏水1000ml,pH值自然;

[0027] 固体土豆培养基(L):土豆200g,葡萄糖20g,琼脂12g,蒸馏水1000ml,pH值自然;

[0028] 单孢菌株制备:将香菇亲本808和868子实体菌盖分别置于培养皿中,15小时后,收集落在培养皿中的孢子,并在无菌水中稀释成适当的浓度,涂布在固体土豆培养基中。25℃培养15天,挑取菌落,进行单核鉴定,保藏备用。

[0029] 单核体细胞菌株制备:868菌株在液体土豆培养基试管25℃静置培养5天,过滤菌丝,用0.1%溶壁酶水解菌丝,固体土豆培养基培养皿上涂布,挑取、鉴定单核菌株,保藏备用。

[0030] ②杂交:

[0031] 单单杂交:单核菌株进行两两对峙杂交,显微镜筛选具有锁装联合的双核菌株。

[0032] 木霉抗性培养基多孢子杂交:制备含有20%的木霉发酵无菌滤液的土豆培养基培养皿,将868单核体细胞接入培养皿中部,利用 $1-4 \times 10^2$ cfu/ml孢子液,距离中部3cm环形涂布接入808亲本孢子,25℃培养20天,在单核体细胞菌落一侧挑取菌株,进行双核菌株鉴定,保藏备用。

[0033] 木霉发酵液的制备:致病性绿色木霉经过活化,接入到含有100ml液体PDA培养基的500ml摇瓶中,25℃培养7天。经离心、过滤,0.22um的膜过滤,划线检验无菌后,获得木霉发酵无菌滤液。

[0034] ③生长速度筛选:通过25℃的PDA培养基测定生长速度,筛选生长快、长势旺盛的杂交菌株。

[0035] ④抗木霉筛选:PDA培养基上与分离到的致病性绿色木霉对峙培养,方法为含有PDA培养基9cm培养皿中,距离中心2cm,先接入活化的杂交菌株25℃培养2天,再对称接入木霉菌饼,25℃培养5天,测定抑制带宽度、杂交菌株向木霉生长半径,

[0036] 抑制率=(对照菌株半径-菌株向木霉生长半径)/对照菌株半径×100%

[0037] 抗木霉能力提高(%)=(对照菌株抑制率-供试菌株抑制率)/对照菌株抑制率×100%。

[0038] ⑤出菇试验:

[0039] 时间:2016年8月至2017年6月;地点:河北灵寿。

[0040] 采用常规香菇栽培配方(杂木屑84%,麸皮15%,石膏1%),并使混合物水含量为62%。采用15cm×58cm塑料袋装栽培料,常压蒸汽灭菌40h。待所述菌袋冷却至25℃后,8月20日接种选择的菌株,并在遮光塑料大棚20-28℃培养50天,进行一次或多次穿孔以调节水含量。培养完成转色后,早晚通风控制温差,菌棒现原基后,开袋出菇。在繁殖的子实体中,筛选出菇早、菇型好、菇质硬、抗性强的菌株。

[0041] 木霉抗性培养皿多孢子杂交和单孢子杂交结果如表1所示,由表1可知,868单孢菌株和808单孢菌株进行单单杂交,经显微镜观察鉴定98个具有锁状联合的双核杂交菌株,生长速度>5.0mm/d的菌株占49.0%,木霉抑制率<50%的菌株占30.6%;而868单核体细胞和808多孢子在木霉抗性培养基中进行木霉抗性培养基多孢子杂交,生长速度>5.0mm/d的菌株占60.6%,木霉抑制率<50%的菌株占65.2%。可见,木霉抗性培养基多孢子杂交方法提高了对生长快、抗木霉能力强的杂交菌株的筛选效率,缩短了选育时间。

[0042] 表1

[0043]

杂交方法	杂交组合	杂交子数量 (个)	生长速度>5.0mm/d 菌株		木霉抑制率<50%的菌株	
			数量(个)	占比(%)	数量 (个)	占比(%)
多孢子杂交	868 体细胞单核菌株×808 多孢子	132	80	60.6	86	65.2
单单杂交	868 单孢菌株×808 单孢菌株	98	48	49.0	30	30.6

[0044] 经过系统选育,以多孢子杂交方法获得香菇杂交菌株“冀香15”。该菌株属于中早熟硬质香菇品种,原基数10-15个,92-98天出菇,出菇温度7-28℃,子实体中大,硬度1.59kg/cm²,潮次分明;在PDA培养基中与木霉对峙,结果如表2所示,抑制率38.3%,抗木霉能力较亲本808提高27.8%。

[0045] 表2冀香15抗木霉能力

[0046]

菌株	木霉对峙菌落半径 (mm)	对照菌落半径 (mm)	抑制率 (%)	提高 (%)
冀香 15	16.9	27.4	38.3	27.8
868	12.6	25.8	51.2	-1.8
808	12.7	24.9	49.0	-

[0047] 将该菌株于2018年1月29日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC) (保藏号:CGMCC No.15279)。

[0048] 为了更好的说明冀香15菌棒的抗虫害能力,进行了不同菌棒虫害发生情况统计,每个品种菌棒统计300棒,结果如表3所示。结果表明,“冀香15”菌棒出菇末期,虫害发生率0.7%,远低于808、0912、L18、868、庆科20、香杂9和冀香29等菌株菌棒,说明冀香15菌棒具有很强的抗虫能力。

[0049] 表3

菌棒	统计数 (棒)	虫害发生数 (棒)	虫害率 (%)
冀香 15	300	2	0.7
808	300	55	18.3
0912	300	47	15.7
[0050] L18	300	85	28.3
868	300	76	25.3
庆科 20	300	103	34.3
香杂 9	300	46	15.3
冀香 29	300	68	22.7

[0051] 实施例2

[0052] 一种杀虫剂的制备方法,包括如下步骤:

[0053] (1) 将出菇结束后的无腐烂变质的冀香15香菇菌棒清洗后,于45℃干燥处理2h,经粉碎处理后,得到40目香菇菌棒粉;

[0054] (2) 将30g的上述香菇菌棒粉与170mL蒸馏水混合,于45℃浸提处理4h,每隔30min搅拌5min,过滤,得到香菇菌棒浸提液,浸提液可直接作为杀虫剂使用,也可以与适量的水混合稀释后再作为杀虫剂使用。

[0055] 实施例3

[0056] 一种杀虫剂的制备方法,包括如下步骤:

[0057] (1) 将出菇结束后的无腐烂变质的冀香15香菇菌棒清洗后,于40℃干燥处理2.5h,经粉碎处理后,得到40目香菇菌棒粉;

[0058] (2) 将30g的上述香菇菌棒粉与150mL蒸馏水混合,于60℃浸提处理3h,每隔30min搅拌5min,过滤,得到香菇菌棒浸提液,浸提液可直接作为杀虫剂使用,也可以与适量的水混合稀释后再作为杀虫剂使用。

[0059] 实施例4

[0060] 一种杀虫剂的制备方法,包括如下步骤:

[0061] (1) 将出菇结束后的无腐烂变质的冀香15香菇菌棒清洗后,于50℃干燥处理1.5h,经粉碎处理后,得到40目香菇菌棒粉;

[0062] (2) 将30g的上述香菇菌棒粉与210mL蒸馏水混合,于30℃浸提处理6h,每隔30min搅拌5min,过滤,得到香菇菌棒浸提液,浸提液可直接作为杀虫剂使用,也可以与适量的水混合稀释后再作为杀虫剂使用。

[0063] 为了更好地说明实施例提供的杀虫剂的特性,对实施例2中得到的香菇菌棒浸提液进行防治菇蝇、果蝇试验即田间试验。

[0064] 对菇蝇、菇蚊的毒性试验:带盖塑料瓶中装入无菌培养的面粉酵母培养物,在平菇大棚中吸引菇蝇在培养物上产卵,28℃培养出菇蝇幼虫;同样方法,吸引菇蚊在培养物上产卵,培养菇蚊。带盖塑料瓶中制备无菌培养的面粉酵母培养物,将幼虫乙醚麻醉,移入塑料瓶中,每瓶40只幼虫,将实施例2中的浸提液稀释配制不同体积浓度的杀虫剂(设50%浸提液、20%浸提液、10%浸提液、5%浸提液和1%浸提液5个处理浓度),每个浓度的杀虫剂喷入量为10ml,三次重复,28℃培养10天,统计菇蝇、菇蚊成虫数量。

[0065] 结果如表4所示,由表中数据可知,浸提液对菇蝇、果蝇具有很强的杀灭作用,喷洒10ml浓度为1%的杀虫剂,防效可达90%以上;喷洒含浸提液5%以上的杀虫剂可100%杀死菇蝇、菇蚊幼虫。

[0066] 表4

[0067]

处理浓度	菇蝇		菇蚊	
	平均数量(只)	相对防效(%)	平均数量(只)	相对防效(%)
1%	2.7	93.1	3.2	91.6
5%	0	100	0	100
10%	0	100	0	100
20%	0	100	0	100
50%	0	100	0	100
对照	39	-	38	-

[0068] 防治双孢菇虫害田间试验:

[0069] 将实施例2中所得的香菇菌棒浸提液稀释成体积浓度为5%的杀虫剂。

[0070] 试验基本情况:杀虫试验在发酵料栽培双孢菇上进行,防治对象包括菇蝇、菇蚊、跳虫、线虫等,地点为武安双孢菇厂。

[0071] 试验方法:发酵好的双孢菇栽培料,均匀混入栽培料质量1%的“冀香15”香菇菌棒粉,接入双孢菇菌种,发酵培养;出菇期每周喷洒1次浓度为5%的杀虫剂(处理组),每次100ml。每个试验区域面积10平方米,随机排列,每个试验区域3次重复,并设清水对照。整个栽培过程不使用其它杀虫剂。二茬菇末期统计害虫数量。

[0072] 结果见表5,由表中数据可知,香菇菌棒浸提液可以有效防治双孢菇菇蝇、菇蚊、跳虫和线虫,平均相对防效分别为97.3%、98.0%、69.2%和88.6%。此外,处理组和对照组两茬菇平均产量分别为17.4kg/m²和12.3kg/m²,喷洒含有浸提液杀虫剂的处理组显著提高了双孢菇产量。

[0073] 表5

[0074]

类别	区域	菇蝇 (只/m ²)	菇蚊 (只/m ²)	跳虫 (只/m ²)	线虫 (只/m ²)	产量 (kg/m ²)
处理	1	0.1	0.2	1.8	1.6	17.5
	2	0.4	0	0.7	0.2	18.0
	3	0	0	1.1	0.8	16.6
	平均	0.17	0.07	1.2	0.87	17.4
对照	1	5.8	2.6	3.4	6.6	12.3
	2	6.5	3.6	4.6	7.5	12.8
	3	7.3	4.2	3.8	8.8	11.9
	平均	6.5	3.5	3.9	7.6	12.3
平均防效 (%)		97.3	98.0	69.2	88.6	-

[0075] 此外,还研究了“冀香15”菌棒浸提液对不同食用菌菌丝生长的影响。

[0076] 将实施例2中所得的香菇菌棒浸提液过滤0.22um的膜除菌,并稀释成体积浓度为20%的杀虫剂。

[0077] 麦粒汁琼脂培养基(1L):麦粒100g煮汁,葡萄糖20g,琼脂15g,蒸馏水1000ml。

[0078] 菌丝生长直径测定:将麦粒汁琼脂培养基融化,冷却到60℃,无菌条件下加入浓度为20%的杀虫剂,定量注入培养皿,每皿15ml。分别在培养皿中部接入经过活化的平菇、香菇、金针菇、双孢菇和姬松茸菌丝,并设清水对照,三次重复,25℃培养7天。测量菌丝生长直径。

[0079] 结果如表6所示,由表中数据可知,香菇菌棒浸提液不抑制平菇、香菇、金针菇、双孢菇和姬松茸的生长,并能一定程度促进菌丝生长。

[0080] 表6

[0081]

处理	对照直径 (mm)				处理直径 (mm)			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均
平菇	35.6	36.0	35.8	35.8	36.6	36.4	36.2	36.4
香菇	29.0	29.4	28.9	29.1	29.6	29.5	30.0	29.7
金针菇	35.0	35.1	34.7	34.9	35.2	35.1	35.3	35.2
双孢菇	27.3	27.2	27.4	27.3	27.9	27.8	27.7	27.8
姬松茸	26.2	25.9	26.2	26.1	26.3	26.2	26.4	26.3

[0082] 为了更好的说明本发明的技术方案,下面还通过对比例和本发明的实施例做进一步的对比。

[0083] 对比例1

[0084] 采用不同品种出菇结束后的无腐烂变质的香菇菌棒,包括冀香29、808、0912、L18、868、庆科20、香杂9,将上述香菇的菌棒采用实施例2的方法,得到对应的香菇菌棒浸提液。

[0085] 以鱼虫为指示,进行了杀虫试验。市场购买鱼虫(又称“水蚤”)液体,均匀分配到试管中,每个试管装15mL。试管中分别加入1ml不同香菇菌棒浸提液,并设清水对照,三次重复。统计加入浸提液前后鱼虫存活数量变化,计算杀虫效果。

[0086] 杀虫效果(%) = [1 - (处理区药后活虫数 × 对照区药前活虫数) / (处理区药前活虫数 × 对照区药后活虫数)] × 100。

[0087] 结果如表7所示,15min时,“冀香15”菌棒浸提液的鱼虫死亡率为67.0%,杀虫效果

最强,强于杂交亲本及主栽品种,也强于同系统杂交选育的香菇菌株。

[0088] 表7

[0089]

菌棒	0min	15min	30min	1h	15min 死亡率 (%)	1h 死亡率 (%)
冀香 15	115	38	2	0	67.0	100
808	120	69	21	7	42.5	94.1
0912	119	78	23	8	34.5	93.2
L18	120	102	31	6	15.0	95.0
868	118	84	25	8	28.8	93.2
庆科 20	130	76	23	9	41.5	93.1
香杂 9	126	55	17	3	56.3	97.6
冀香 29	125	67	20	2	46.4	98.4

[0090] 由以上数据可知,本发明实施例所得到的杀虫剂可有效防治菇蝇、菇蚊、鱼虫等虫害,保护食用菌等免受虫害,无毒副作用,安全高效,保障食品安全。

[0091] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换或改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。